

Ralph Gitomer AU 1651

1/34/1 (Item 1 from file: 347)
06456124 **Image available**

**MEASUREMENT OF ELIMINATION ACTIVITY OF ACTIVE OXYGEN SPECIES OF
MEDICINE AND FOODS**

Pub. No.: 2000-041697 [JP 2000041697 A]

Published: February 15, 2000 (20000215)

Inventor: TAKASHIMA SEISUKE

YAMANE TAKEYO

Applicant: UNIV OKAYAMA

SHADAN YAMANE IIN

Application No.: 10-220728 [JP 98220728]

Filed: August 04, 1998 (19980804)

International Class: C12Q-001/26; G01N-021/25; G01N-033/02; G01N-033/15; A61K-035/78

ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method capable of simply measuring SO(super oxide) elimination activity of a Chinese medicine being a multicomponent-based natural medicine on site of preparation.

SOLUTION: This method for measuring elimination activity of active oxygen species of medicines and foods by using a cytochrome-C reduction reaction comprises mixing an aqueous solution of extracted solution of a medicine or a food with cytochrome-C and hypoxanthine, formulating the mixed solution with xanthine oxidase and measuring an absorption spectrum of visible region of specimen at 549-551 nm after a fixed time.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2003 JPO & JAPIO. All rights reserved.

© 2003 The Dialog Corporation

1/34/2 (Item 1 from file: 351)

013043777

WPI Acc No: 2000-215630/200019

**Measurement of active oxygen elimination, for
pharmaceuticals and food products - comprises reduction of cytochrome-C**

Patent Assignee: IRYO HOJIN SHADAN YAMANE IIN (IRYO-N); UNIV OKAYAMA
(UYOK-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2000041697	A	20000215	JP 98220728	A	1998080	200019 B

Priority Applications (No Type Date): JP 98220728 A 19980804

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2000041697	A		7	C12Q-001/26	

Abstract (Basic): JP 2000041697 A

NOVELTY - The elimination of active oxygen, present in pharmaceuticals and food products is measured by the reduction of cytochrome-C.

USE - The method is useful for measuring the elimination of active oxygen in pharmaceuticals and food products.

ADVANTAGE - The elimination test is simplified. Automated measurement is enabled.

Dwg.0/5

JP 2000041697 A

NOVELTY - The elimination of active oxygen, present in pharmaceuticals and food products is measured by the reduction of cytochrome-C.

USE - The method is useful for measuring the elimination of active oxygen in pharmaceuticals and food products.

ADVANTAGE - The elimination test is simplified. Automated measurement is enabled.

Dwg.0/5

Derwent Class: B04; D13; D16; J04; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/26

International Patent Class (Additional): A61K-035/78; G01N-021/25;

G01N-033/02; G01N-033/15

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2003 The Dialog Corporation

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許公開番号

特開2000-41697

(P2000-41697A)

(43) 公開日 平成12年2月15日 (2000. 2. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	2 G 0 5 9
G 0 1 N 21/25		G 0 1 N 21/25	4 B 0 6 3
33/02		33/02	4 C 0 8 8
33/15		33/15	Z
// A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	Z
審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 7 頁)			

(21) 出願番号 特願平10-220728

(22) 出願日 平成10年8月4日 (1998. 8. 4)

(71) 出願人 394025980

岡山大学長

岡山県岡山市津島中一丁目1番1号

(71) 出願人 597131392

医療法人社団山根医院

広島県山県郡筒賀村大字上筒賀80番地1

(72) 発明者 高島 征助

岡山県倉敷市倉敷ハイツ9-7

(72) 発明者 山根 健世

広島県山県郡筒賀村大字上筒賀80番地1

(74) 代理人 100075960

弁理士 森 廣三郎

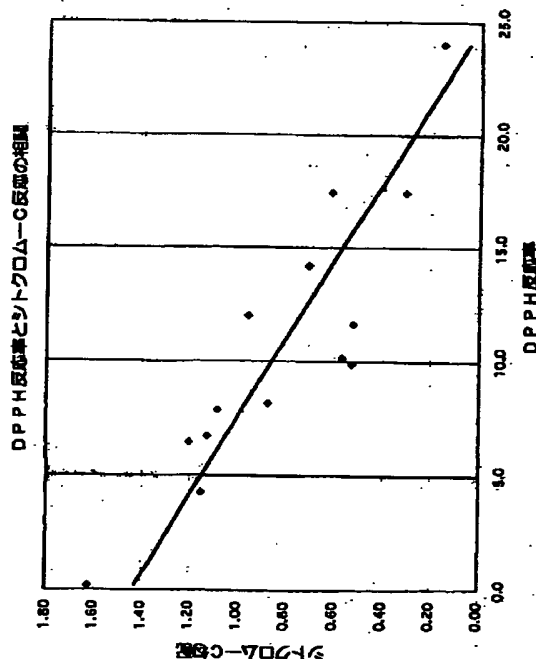
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬品、食品類の活性酸素種の消去活性測定方法

(57) 【要約】

【課題】 多成分系の天然医薬品である漢方薬であるS O消去活性を調剤の現場において簡単に測定することが可能であり、その薬効を明らかにする有効な方法を確立する。

【解決手段】 シトクロム-Cの還元反応を利用した医薬品、食品類の活性酸素種の消去活性測定方法であり、医薬品あるいは食品類の水溶液又は抽出液にシトクロム-C、ヒポキサンチンを混合し、その混合液にキサンチンオキシダーゼを添加混合し、所定時間後に549～551nmにおける可視部吸収スペクトルを測定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 シトクロム-Cの還元反応を利用した医薬品、食品類の活性酸素種の消去活性測定方法。

【請求項2】 医薬品あるいは食品類の水溶液又は抽出液にシトクロム-C、ヒポキサンチンを混合し、その混合液にキサンチンオキシダーゼを添加混合し、所定時間後に549～551nmにおける可視部吸収スペクトルを測定することを特徴とする医薬品、食品類の活性酸素種の消去活性測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、特に医薬品、食品類の活性酸素種の消去活性測定方法に関するものであり、多成分系の天然医薬品である漢方薬のSO消去活性を調剤の現場において簡単に測定することが可能であり、その薬効を明らかにする有効な方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血液中に極低濃度に生成するスーパーオキシド(Super Oxide, 以下SOと略記)はそれに対する特定の酵素: スーパーオキシドディスムターゼ(Super Oxide Dismutase, 以下SODと略記)によって過酸化水素に変えられ、その過酸化水素は特定酵素: カタラーゼによって水と酸素に分解されて無害化されることが明らかにされている。しかしながら、SOは高反応性物質であり、酵素の代謝系のバランスが崩れ、SODに対してSOが過剰に産生される状態になると、血管、粘膜などの内皮組織を損傷し、マクロ的には血管病変や組織のガン化として顕在化する。このような生体内の好ましくない代謝に対する予防・治療法としてSOD活性増強能を有する医薬品が投与されている。しかし、果たしてその医薬品がどの程度のSO消去活性を有するのかという点については明らかではない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】このように、医薬品のSO消去活性に関して、十分な検証がされていない原因の一つは、SOが極短寿命物質であり、それ自体を直接測定することが困難であることに他ならない。したがって、通常、血液あるいは本発明の対象となる医薬品のSO消去活性を測定しようとする場合には、それらのSOD活性を測定するという間接的な測定法が採用されている。しかも、その測定法は電子スピン共鳴吸収スペクトル法(ESR)が主流である。この方法は活性酸素種などラジカルの測定法としては高感度・高精度であり最適の方法であるが、機器が高価額で、調剤の現場に普及することは経済的に困難である。本発明者らは、現場で測定対象の医薬品のSO消去活性を簡単に測定する方法について鋭意検討した。

【0004】本発明者は医薬品のうち、とくに多成分の物質で構成されている天然薬物(漢方薬)の薬効を把握したり、あるいは民間薬や食品、例えば、各種ビタミン

類、ゲンノショウコ、ドクダミ、ハトムギ茶、枸杞茶、杜仲茶などをはじめローヤルゼリー、プロポリス、フノリ、ブルーベリー等の栄養効果を把握するために種々の角度から検討を行っている過程において、比色分析法によって、それぞれの医薬品のSO消去活性を相対的に把握できることを見出し、先に提案したところである(特願平9-354627号)。

【0005】上記特願平9-354627号記載の方法は、医薬品の水溶液、あるいは食品の抽出液中にキサンチンあるいはヒポキサンチンのリン酸緩衝液とキサンチンオキシダーゼのリン酸緩衝液を添加・混合し、さらにジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)のアルコール溶液を混合してDPPH/アルコール溶液の褪色の度合いから薬剤の活性酸素種の消去活性を評価することの特徴とする医薬品における活性酸素種の消去活性の評価方法である。

【0006】先に述べたように、血液中に生成するスーパーオキシド(O_2^- , 以下SOと略記)は血管病変、体内組織のガン化などの引き金役目を果たすることが指摘されガンの予防医学上重要な要因と考えられている。このような背景から市場には血液中のSOを消去する効果を有するとされる医薬品および食品類が多数出回っているが、現実には、それらの薬品、食品がSO消去活性をどの程度有するかを検証することは、かなり困難な作業を伴うことが、従来技術の説明から容易に理解できる。

【0007】本発明者らは、医療現場で、測定対象の医薬品のSO消去活性を簡単に測定する方法が必要であることに鑑み、先に開発したDPPH法に引き続いて、これの解決につき鋭意検討した。

【0008】

【課題を解決するための手段】その結果、SOによるシトクロム-Cの $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ の還元反応に伴う色調の変化(薄赤色の濃色変化: 550nm)に着目し、その極大吸収波長位置の吸光度の経時的変化を測定したところ、同一抽出条件で処理した種々の漢方薬の抽出液を添加した際の、測定溶液の所定の測定時間における吸光度を比較することによって、短時間で種々の漢方薬のSO消去活性に関する知見が得られることを見出した。すなわち、シトクロム-Cの還元反応を利用した医薬品、食品類の活性酸素種の消去活性測定方法である。

【0009】ここで、シトクロム-Cについて簡単に説明する。シトクロムはヘモグロビン類、ミオグロビン、ペルオキシダーゼ及びカタラーゼを除くすべての細胞内ヘムタンパク質で鉄の原子価の可逆的な変化に伴って電子又は水素を伝導するものである。シトクロム-C(Cyt-C)は、549～551nmに可視部の吸収帯を有するポルフィリンのシトクロムから得られるビリジンヘモクロモゲンである。分子量13,000、1分子に1個のヘムを含み、等電点がpH約10、ポルフィリンはビニル基を通じてタンパク質の2つのSHと共有結合をつくる物質であ

る。

【0010】シトクロム-Cの還元反応は、具体的には次のようにして行う。すなわち、医薬品あるいは食品類の水溶液又は抽出液にシトクロム-Cとヒポキサンチンを混合し、その混合液にキサンチンオキシダーゼを添加混合し、所定時間後に549～551nmにおける可視部吸収スペクトルを測定することを特徴とする医薬品、食品類の活性酸素種の消去活性測定方法とするのである。

【0011】シトクロム-Cを用いるこの方法と同時に、本発明者らが先に明らかにした、漢方薬の抽出液によるジフェニルピクリルヒドラシル/メタノール(DPPH/MeOH)溶液の褪色現象(515nm)と組み合わせると、両者間に負の直線関係が成立することも確認され *

*た。

【0012】本発明のシトクロム-Cの減色変化は比較的緩慢で1検体当たり5分間の測定時間を要するが、先のDPPHの褪色変化は瞬時に進行するという利点もあることから、同一試料についてこれらの2種類の反応について検討することによって、その漢方薬のSO消去活性に関する知見はより確実なものになる。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明で使用した漢方薬の主成分と薬効を表1に一括して示す。

【0014】

【表1】

名 称	主 成 分	薬 効
カンゾウ	サポニン、フラボノイド類、糖類	鎮咳、去痰、利尿、緩下
ケイシ	精油、ジテルペノイド、糖類、タンニンなど	芳香性健胃、発汗、解熱
サイコ(日本製)	サポニン、脂肪油など	解熱、消炎、ステロイド様作用
ビワヨウ	トリテルペノイド、精油、ursolic acid/mucic acid	消炎、利尿、健胃
トウヤク	キサンチン誘導体、フラボノイド誘導体など	消火液分泌亢進
コウボク	アルカロイド類、salicifoline精油類、ジフェニル化合物など	収斂、利尿、去痰、鎮静
チョウジ	精油類、トリテルペノイド類、脂肪油、タンニンなど	鎮静、抗菌、抗ウイルス
センコフ	アルカロイド類、タンニンなど	鎮静
ソボク	brasiliinなどの色素類	鎮痛、抗炎症、高脂血症改善
ボタンビ	フェノール類、モノテルペン配糖体、タンニンなど	消炎、血流改善、鎮痛
ショウマ	トリテルペノイドなど	解熱、鎮痛、発汗、消炎
ニンドウ	タンニン、サポニン	解熱、利尿、消炎
マオウ	アルカロイド類など	発汗、解熱、鎮咳、消炎
オウゴン	フラボノイド類、糖類	消炎、利尿、利胆、解毒
インチンコウ	精油類、クマリン類、フラボノイド類など	黄疽
チャヨウ	アルカロイド類、タンニン、精油類、サポニンなど	利尿、解毒、中枢興奮、脂肪分解阻害、突然変異阻害

【0015】それぞれの漢方薬の乾燥試料を密栓付き試験管に約0.1g精秤採取して、蒸留水10mlを添加して70℃にて1時間抽出処理した。抽出液を採取して、1)シトクロム-Cの還元反応によるSO消去活性の測定、2)DPPHの褪色挙動の測定を行った。

【0016】シトクロム-Cの還元反応によるSO消去活性の測定はシトクロム-Cの分子内のFe³⁺はSOによって還元されてFe²⁺となる。その際、可視部吸収スペクトルの550nmの極大吸収位置の吸光度が増大する。その詳細は、八木国夫、中野稔監修「活性酸素・化学・生物・医学」89頁、医歯薬出版に記載されている。この吸収の吸光度の経時的変化を追跡して反応時間に対してプロットすると、各試料間のSO消去活性の速度論的な比較が可能である。

【0017】

※【実施例】以下、実施例により具体的に説明する。

実施例1

測定に使用した試薬溶液は次の4種である。

(1)漢方薬の抽出液

40 (2)シトクロム-C(Cyt-C): 2.60×10^{-4} g/ml・PBS

(3)ヒポキサンチン(Hyp x): 2.97×10^{-4} g/ml・PBS

(4)キサンチンオキシダーゼ(XOD): 1.99×10^{-4} g/ml・PBS

【0018】上記の試薬溶液を、

(1)1.0ml + (2)5.0ml + (3)1.0ml + (4)1.0mlの順に添加・混合して、(4)を添加した時点から反応開始時として、タッチミキサーで30秒間攪拌した。この混合溶液を石英製測定用セル(光路長: 10mm)へ上部に空間を

※50

作れないように充填して密栓した。反応開始後、1分から1分毎に5分後まで可視部吸収スペクトルを測定した(測定波長領域: 400~700nm, 550nmにおける吸光度: A_t)。

【0019】ネガティブブランク試験には(1),(4)にPBS: 1.0mlを用いた(550nmにおける吸光度: A_{0t})。また、ポジティブブランク試験には(1)にPBS: 1.0mlを混合して同様の操作を行った。各試料のスペクトルの550nmにおける吸光度をベースライン法で計測(ピーク高さ、nm)した。ネガティブブランク試験のスペクトルの吸光度: A_{0t} を基準にして、各試料の吸光度: A_t との相対強度: A_t/A_{0t} を測定時間に対してプロットして、反応開始30秒後の相対強度を内挿法にて算出して、その数値を、各試料のSO消去活性とした。すなわち、試料のSO消去活性が高ければ高いほど、シクロム-Cの分子内の $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ の還元反応が抑制され、その試料の吸光度の相対強度は低値になるのである。一例としてチャヨウの可視部吸収スペクトルを図1(a)~(c)に示す。(a)はネガティブブランク、(b)は反応開始1分後、(c)は反応開始5分後のものである。

【0020】比較例

先に特願平9-354627号で提案したDPPHの褪色挙動について、上記本発明実施例のシクロム-Cの発色試験と対比するために以下のように実施した。

*

試料名	比較例 DPPH反応性 (%)	実施例1 還元性 (Cyt-C)	実施例2 酸化性 (フェントン反応)
チャヨウ	10.1	0.57	1.54
インチンコウ	9.9	0.53	2.55
オウゴン	17.5	0.62	2.09
マオウ	11.7	0.52	1.94
ニンドウ	4.2	1.15	1.58
ショウマ	12.0	0.96	2.22
ボタンビ	14.2	0.71	1.34
ソボク	6.5	1.20	1.42
センコツ	17.5	0.31	2.66
チョウジ	24.0	0.15	3.39
コウボク	8.2	0.87	2.25
トウヤク	6.8	1.13	1.19
ビワヨウ	7.9	1.08	1.49
サイコ	0.2	1.62	1.10
ケイシ	0.6	1.62	1.04
カンゾウ	0.3	1.23	1.23

【0025】このように、漢方薬のSO消去活性とDPPH/MeOHの褪色現象の間に負の直線関係が成立することは、極めて興味あると同時に、これらの試薬をキット化することによって漢方薬に留まらず通常の薬品、食物のSO消去活性をESRなど大型機器を使用することなく、簡単な比色計、さらには肉眼的観察によってもラフスクリーニングが可能になる。

【0026】実施例2

上述したようにDPPH/MeOHの褪色挙動は短時間 ※50

*【0021】DPPHの褪色挙動の測定

(1)漢方薬(センコツ)の抽出液

(2)DPPH/MeOH: 5.06×10^{-5} g/ml

試料溶液のうちには1.0ml使用するとDPPH/MeOHが完全に褪色してしまう場合もあった。したがって抽出液量を適宜(0.25~1.0ml)してDPPH 5.0mlと混合した。DPPH/MeOHを添加した時点を反応開始時として1分後から1分毎に5分間可視部吸収スペクトルを測定した(測定波長領域: 400~800nm)。その一例としてセンコツの抽出液を図2(a),(b)に示す。(a)はブランク、(b)はセンコツ抽出液である。

【0022】しかし、この反応は短時間で完了し、1~5分間で極大吸収波長位置: 515nmの吸光度は変化しなかった。そこで、反応開始後1分の515nmの吸光度(A)を、試料と同量の蒸留水をDPPH/MeOH: 5.0mlに添加した際の吸光度(A_0 、ネガティブブランク)で除した値をDPPH反応率として褪色挙動に関するインジケータとした。

【0023】実施例1のシクロム-C、比較例のDPPHの測定結果を一括して表2に示す。また、これらの結果を図示すると図3のようになり、負の直線関係が成立した。

【0024】

【表2】

※で反応が完了することから、その反応率は漢方薬のSO消去活性を予測するための有効なパラメータになる。そのためには漢方薬の反応性についてさらに知見が必要である。そこで、実施例1とは逆の反応性である酸化反応についての検討も行った。

【0027】すなわち、液相の酸化反応(フェントン反応、上述の文献の73頁)



において、漢方薬の抽出液が触媒効果をするならば、反

応液は濃色化することを利用しようとするものである。

【0028】(1)漢方薬の抽出液

(2)1%フェロシアン化カリウム水溶液

(3)1%過酸化水素水

上記の試料溶液を、

(1)1.0ml + (2)5.0ml + (3)1.0ml

の順で添加して、(3)を添加した時点を実験開始時とし、タッチミキサーで30秒間攪拌した後、実施例1及び比較例の場合と同様に可視部吸収スペクトルを測定した(測定波長領域、400~500nm、極大吸収波長位置:423nmの吸光度、 A_t)。ブランク試験は(1)に漢方薬の抽出液の代わりに蒸留水:1.0mlを用いて同様の操作を行った(吸光度: A_0)。反応時間に対して相対強度(A_t/A_0)をプロットし、反応開始後30秒における吸光度の相対強度を内挿法にて算出して、試料の酸化反応性を比較した。それらの測定結果も一括して上記表2に示す。

【0029】また、DPPH反応率~酸化性の関係を図示すると図5のようになり、図3とは逆に正の直線関係が成立した。したがって、DPPHの褪色現象は酸化反応によることが判明した。

【0030】このように漢方薬のSO消去活性は、シトクロム-Cの薄赤色の濃色化を観察することで直接的に判定可能であり、また、DPPHの褪色挙動からも類推可能である。

【0031】

【発明の効果】現在、市場では漢方薬、民間薬そして各種の健康食品が多品種・大量に出回っており、それらの効能書には活性酸素種の消去活性についての記述がなされているものもあるが、簡単な検査方法が確立されていないため、その信頼性は乏しい。そこで、本発明の試薬をキット化することによって、容易に、それらのSO消去活性のスクリーニングが可能になる。また、これらの試薬を搭載した自動測定装置の開発も容易である。

【図面の簡単な説明】

【図1】漢方薬(チャヨウ)のSO消去活性を示すスペクトルであり、(a)はネガティブブランク、(b)は反応開始1分後、(c)は反応開始5分後のものである。

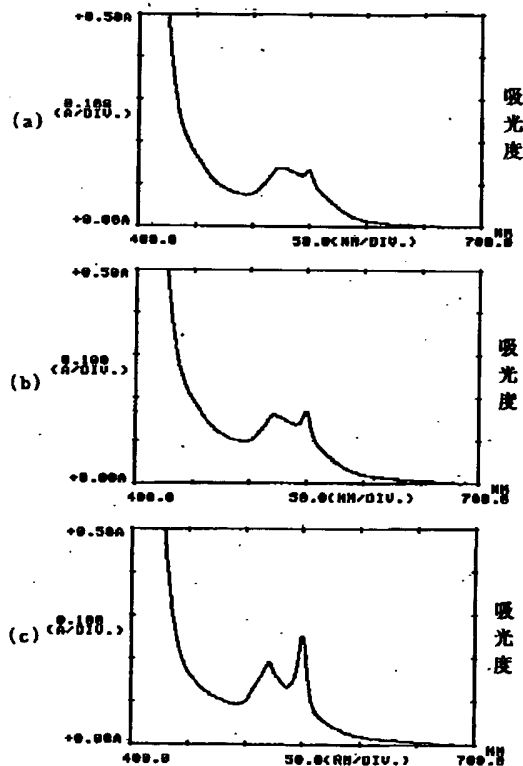
【図2】漢方薬(センコツ)のDPPH反応性を示すスペクトルであり、(a)はブランク、(b)はセンコツ抽出液である。

【図3】DPPH反応率とシトクロム-C勾配との関係を示すグラフである。

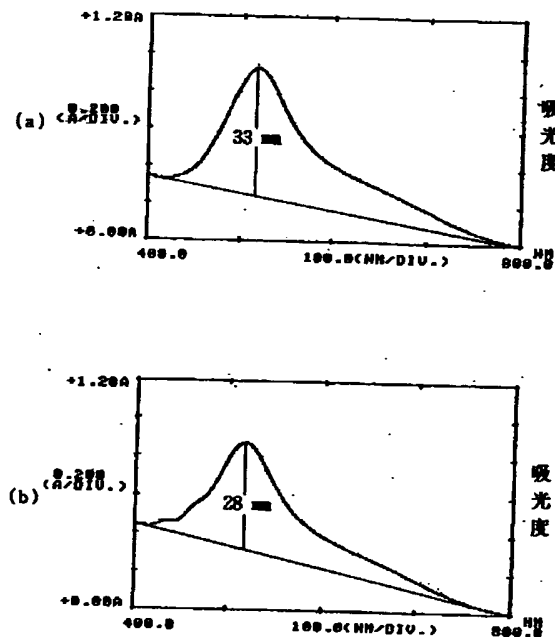
【図4】漢方薬(チョウジ)のフェントン反応のスペクトルであり、(a)は反応開始1分後、(b)は反応開始5分後のものである。

【図5】DPPH反応率とフェントン反応勾配との関係を示すグラフである。

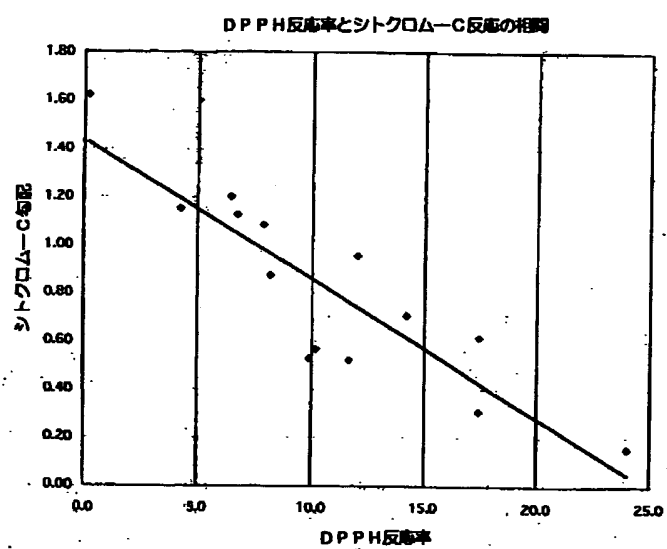
【図1】



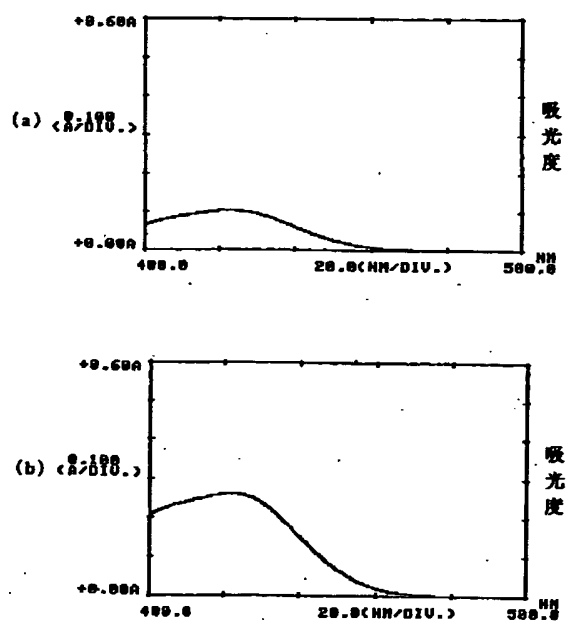
【図2】



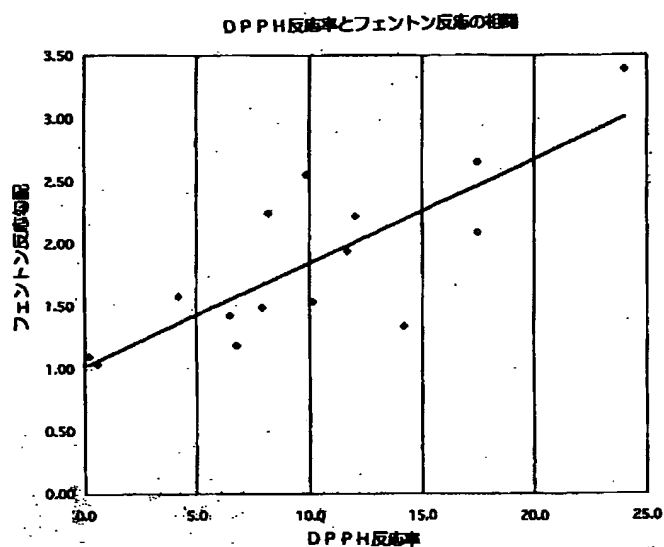
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G059 AA05 BB11 BB15 BB20 CC20
 DD04 DD05 EE01 EE12 FF04
 4B063 QA05 QQ89 QR03 QR41 QX01
 4C088 AA14 AB04 AB12 AB29 AB32
 AB33 AB38 AB39 AB40 AB45
 AB47 AB48 AB51 AB52 AB55
 AB57 AB58 AB60 AB65 AB67
 AB77 AB99 AC01 AC03 AC05
 AC06 AC11 AC13 AD10 BA03
 BA08 BA11 BA14 BA19 MA52
 ZA02 ZA05 ZA07 ZA08 ZA30
 ZA36 ZA62 ZA63 ZA66 ZA69
 ZA76 ZA81 ZA83 ZB11 ZB33
 ZC19 ZC21 ZC33 ZC37 ZC78